



Università degli Studi di Palermo  
Dipartimento di Scienze per la promozione della salute  
“G. D’Alessandro”

**Dottorato di Ricerca in Scienze e tecnologie diagnostiche in ambito  
biomedico  
XXII Ciclo**

**Valore predittivo di variabili clinico-laboratoristiche in  
pazienti con mielofibrosi trattati con inibitore di JAK-1/2**

Dottorando

Dr. Domenica Caramazza

Coordinatore

Prof. Vito Franco

Tutor

Prof. Sergio Siragusa

Anno accademico 2009/2010

## **Indice**

Introduzione	pag. 3
JAK chinasi ed interazione con i recettori citochinici	pag. 9
CYT387	pag. 14
Gli effetti di CYT387 sulle citochine plasmatiche nei modelli murini di MPN	pag. 15
Obiettivo dello studio	pag. 17
Disegno dello studio	pag. 18
Materiali e metodi	pag. 19
Risultati	pag. 22
a) Analisi del ruolo predittivo di diverse variabili clinico-laboratoristiche	pag. 26
b) Analisi del ruolo predittivo delle citochine circolanti	pag. 28
Discussione	pag. 30
Bibliografia	pag. 34

## **Introduzione**

La mielofibrosi primaria (PMF) è una neoplasia mieloproliferativa (MPN) Philadelphia-negativa con un'incidenza compresa tra 0.3 e 1.5 casi su 100000,<sup>1,2</sup> caratterizzata da fibrosi del midollo osseo, splenomegalia, anemia, sintomi debilitanti, scarsa qualità di vita e riduzione della sopravvivenza. L'età mediana di presentazione è di 60 anni e approssimativamente il 10% dei pazienti hanno un'età di 45 anni o più bassa.<sup>3</sup> Attualmente, la terapia di scelta è, di fatto, quella palliativa, volta ad alleviare i sintomi legati alla splenomegalia, a tenere sotto controllo la mieloproliferazione e a migliorare l'anemia e le altre citopenie. Il trapianto di midollo osseo allogenico è un'altra possibilità, ma questa procedura è associata ad una morbidità e ad una mortalità significative e si può offrire, in genere, solo ai pazienti più giovani.<sup>4</sup> Tra tutte le MPN associate alle proteine JAK, la PMF è quella con la prognosi più sfavorevole e con un rischio più elevato di evoluzione verso una leucemia acuta.<sup>5</sup>

Circa la metà dei pazienti colpiti da PMF sono portatori di una mutazione del gene della “Janus kinasi”<sup>2</sup> (JAK2 V617F) che contribuisce alla fisiopatologia di questa condizione, provocando un aumento della produzione di cellule del sangue.<sup>6</sup> Per molti fattori di crescita [eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), fattore stimolante colonie di granulociti (G-CSF)] la fosforilazione di residui tirosinici è cruciale nella trasduzione del segnale (passaggio di informazione dall'esterno

della cellula all'interno del nucleo passando per il citoplasma). EPO e TPO, dopo essersi legate al recettore di membrana, utilizzano un sistema di chinasi dette JAK e STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) per la trasduzione del segnale all'interno del nucleo. Esistono 4 proteine JAK: Jak1, Jak2, Tyc2, espresse ubiquitariamente, e Jak3 espressa solo nelle cellule mieloidi e linfoidi. La proteina JAK2 è composta da sette domini: da JH1 a JH7. JH1 è la regione ad attività chinastica, cioè quella deputata a promuovere l'attivazione delle successive chinasi nel processo di trasduzione del segnale. Diversamente, JH2 è un dominio pseudo-chinasico con attività autoinibitoria sul dominio JH1, cioè in grado di inibire l'attività di JH1 qualora fisiologicamente necessario, che viene inattivato in presenza della mutazione V617F.<sup>7-11</sup>

Nella PMF il midollo presenta un'elevata proliferazione fibroblastica con aumentata produzione di fibre collagene e conseguente fibrosi midollare.<sup>13,14</sup> Poiché i fibroblasti non sono clonali,<sup>15-17</sup> si tratta di un processo reattivo secondario alla secrezione di varie citochine<sup>17</sup> [fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), fattore di crescita trasformante beta (TGFb), fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF)] da parte delle cellule del clone patologico, ed particolare da parte dei megacariociti<sup>18</sup> e dei monociti.<sup>19</sup> Alcune di queste citochine (VEGF, bFGF) sono responsabili anche di un aumento della neoangiogenesi midollare. Tale dato ha un importante risvolto clinico perché

spiega l'efficacia terapeutica di alcuni farmaci ad azione anti-angiogenetica come la talidomide o suoi derivati come la lenalidomide.<sup>20</sup> Studi recenti hanno documentando un rilevante incremento dell'angiogenesi nella PMF e nella mielofibrosi secondaria rispetto alla policitemia vera (PV) ed alla trombocitemia essenziale (ET). Nelle fasi più avanzate della malattia la fibrosi midollare può associarsi ad osteosclerosi. I processi biologici responsabili del rimaneggiamento della matrice extracellulare non sono ancora completamente chiariti.<sup>14</sup>

È dimostrato da tempo che i megacariociti ed i monociti attivati possono produrre citochine. Inoltre, una interazione patologica tra megacariociti e neutrofili (emperipolesi), indotta da un'alterata distribuzione di P-selectina nei megacariociti, potrebbe essere alla base del rilascio di citochine con meccanismi anormali. Inoltre enzimi derivati dai neutrofili, tra cui l'elastasi, potrebbero partecipare al processo patologico, facilitando il passaggio di progenitori mieloidi nel sangue periferico.<sup>21,22</sup>

Modelli murini di mielofibrosi hanno fornito ulteriori informazioni riguardanti il ruolo di alcune citochine nella patogenesi della reazione stromale nella mielofibrosi con metaplasia mieloide.<sup>23,24</sup> Ci sono attualmente due modelli sperimentali di mielofibrosi nei topi: "TPOhigh" e topi "GATA-1 low". Il primo è caratterizzato dalla sovra espressione sistemica di trombopoietina<sup>25-27</sup> ed il secondo dal blocco di maturazione dei megacariociti mediato dalla ridotta

espressione del fattore di trascrizione GATA-1.<sup>28</sup> La caratteristica comune ad entrambi i modelli sperimentali è l'accumulo dei megacariociti, a seguito della proliferazione TPO-guidata<sup>29</sup> nei topi “TPOhigh” e della compromessa maturazione dei megacariociti nei topi “GATA-1 low”.<sup>30</sup> Tuttavia, vi è una notevole eterogeneità esistente tra i diversi modelli murini in termini di fenotipo. Nei topi immunodeficienti, la mielofibrosi e l'osteosclerosi si sviluppano solo nel modello con grave immunodeficienza combinata (cellule T e B carenti) e sono attribuite all'alto grado di espressione di TPO, rispetto al modello nudo (cellule T carenti). Inoltre, la mielofibrosi indotta nei topi “TPOhigh” è reversibile mediante il trapianto o la cessazione della somministrazione sistemica di TPO.<sup>26,31,32</sup>

Le chinasi della famiglia JAK sono necessarie per la trasduzione del segnale da parte di citochine e di fattori di crescita. Sembra esservi una certa sovrapposizione di ruoli per i membri della famiglia JAK nei meccanismi di trasduzione ad opera di diverse citochine e fattori di crescita, con l'eccezione di alcuni fattori di crescita come l'EPO e la TPO, che utilizzano solo JAK2. JAK1 svolge un ruolo fondamentale nel mediare il segnale di un certo numero di citochine pro infiammatorie, spesso in associazione con altre chinasi della famiglia JAK. JAK3 svolge un ruolo importante nella mediazione dei segnali generati dall'interleuchina (IL)-2 nella funzione immunitaria. Tyk2 sembra funzionare in associazione con JAK2 e JAK3 nella trasduzione del segnale di citochine come IL-12 e IL-

23.<sup>33-35</sup> Gran parte della attuale conoscenza sul ruolo degli enzimi JAK proviene da studi sui topi con deficit mirato di ogni membro della famiglia JAK.<sup>36</sup>

I topi “knockout” per JAK1 mostrano un fenotipo perinatale letale che si crede sia dovuto alla suzione compromessa. Questi topi hanno anche un difetto nello sviluppo e nella funzione linfoide come conseguenza di un mancato segnale da parte di citochine attraverso JAK1. La carenza di JAK2 si manifesta come letalità embrionale, a 12 giorni, a causa di un danno definitivo a carico dell'eritropoiesi. I topi JAK3-deficienti hanno una immunodeficienza combinata grave (SCID). Le trasduzioni aberranti del segnale da parte di una tirosina chinasi possono essere leucemogene, e diverse linee di cellule leucemiche mostrano che il segnale mediato da JAK/STAT è esagerato nelle neoplasie ematologiche e probabilmente contribuisce alla patogenesi di queste malattie.<sup>6,11,36</sup> Questi meccanismi comprendono, ad esempio, a) la comprovata capacità di JAK/STAT di aumentare la trascrizione di geni come “myelocytomatosis” aviaria virale oncogene omologo (c-Myc), ciclina D, “Mieloid cell leukemia-1”(Mcl-1) e linfoma a cellule B-extra large (Bcl-XL), che influenzano la crescita, la proliferazione, sopravvivenza e la differenziazione di cellule maligne, b) la constatazione che alti livelli di inibitori di JAK chinasi, compresi gli inibitori del segnale delle citochine (SoC) e delle fosfatasi [come “anti-src homology phosphatase” (SHPs) e “protein tyrosine phosphatase” (PTP)], sono un evento comune nei tumori

ematologici, c) elevati livelli di citochine e di fattori di crescita, che sono attivi attraverso gli enzimi JAK si trovano in vari tipi di tumori ematologici.<sup>37</sup> Mutazioni di JAK1 che determinano una iperattivazione della chinasi sono state riscontrate recentemente in adulti affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule T (ALL-T).<sup>38</sup> La mutazione di JAK1 ha ridotto significativamente sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale, rispetto ai pazienti senza la mutazione.<sup>38</sup>

L'espressione di livelli elevati di citochine nella PMF si ritiene rappresenti una risposta infiammatoria che contribuisce al fenotipo clinico, tramite la trasduzione del segnale attraverso JAK1, fra cui la fibrosi del midollo osseo, l'angiogenesi, l'ematopoiesi extramidollare, i sintomi costituzionali e la cachessia.

Recenti studi con farmaci inibitori di JAK1/2, soprattutto con la molecola INCB018424 (Tabella 1), hanno dimostrato la *down*-regolazione farmaco-indotta di citochine pro infiammatorie, tra cui IL-6, IL-1 recettore alfa (RA) e IL-8, che è stata accompagnata da un miglioramento soprattutto in termini di sintomi costituzionali nei pazienti con mielofibrosi. Queste osservazioni suggeriscono che i livelli plasmatici delle citochine nella PMF o nella post-PV/ET MF potrebbero essere utilizzati per la previsione ed il monitoraggio della risposta al trattamento.<sup>39</sup> Uno studio condotto recentemente presso la Mayo Clinic di Rochester ha mostrato, attraverso l'analisi dei livelli di 30 citochine circolanti alla diagnosi in pazienti con



PMF, che elevati livelli sierici di IL-2R, IL-8, IL-15 e chemochina CXC ligando-10 (CXCL10)<sup>40</sup> possono predire una ridotta sopravvivenza indipendentemente dal DIPSS score<sup>41</sup> e dalla categoria di rischio citogenetico.<sup>42</sup>

**Tabella.1 Dati clinici preliminari degli inibitori di JAK2 in trials selezionati.**<sup>43</sup>

Agent	Company	Target(s)	JAK IC <sub>50</sub> (nM)	Current phase	Preliminary clinical observations in myelofibrosis studies
INCB018424	Incyte	JAK1, JAK2	JAK1 = 2.7* JAK2 = 4.5* JAK3 = 322*	III	Decreased spleen size irrespective of JAK2 mutational status; improved quality of life, weight and performance; decreased inflammatory cytokine levels. Myelosuppression.
TG101348	TargeGen	JAK2	JAK1 = 105 JAK2 = 3 JAK3 = 996	II	Decreased spleen size; decrease in WBC. Myelosuppression; gastrointestinal disturbance.
XL019	Exelixis	JAK2	JAK1 = 132 JAK2 = 2 JAK3 = 250	discontinued	Decreased spleen size only in patients with JAK2 V617F or MPL mutation; decreased pruritis and improved fatigue. Neurotoxicity.
CEP701 (lestauritinib)	Cephalon	JAK2, FLT3	JAK2 = 1	I/II	Decreased spleen size, improvement in blood cell count. Myelosuppression; gastrointestinal disturbance.

\*Assays performed at 1 mM ATP concentration.

## JAK chinasi ed interazione con i recettori citochinici

La famiglia delle chinasi Janus è stata oggetto di fervido studio negli ultimi anni, e l'interesse verso questa particolare famiglia di tirosin-chinasi non recettoriali si è ampliato fino a comprendere campi piuttosto distanti fra di loro: è ormai stato chiarito, infatti, come queste molecole siano coinvolte nella trasduzione del segnale mediato da numerose citochine, implicate a vario titolo nella maturazione e nella differenziazione delle cellule ematopoietiche, nella generazione e regolazione delle risposte immunitarie, ed è stato altrettanto ben documentato il modo in cui le loro alterazioni (sia in

termini di aumentata o diminuita espressione genica, sia in termini di mutazioni) contribuiscano alla patogenesi di alcune immunodeficienze e di malattie ematologiche.

La famiglia JAK consta di quattro membri, JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2, e deve il suo nome ad una delle peculiarità della struttura terziaria di queste proteine, che, presenta due domini speculari, perciò i ricercatori si sono ispirati nell'appellarli al dio romano bicefalo Giano (Janus) conosciuto come Giano bifronte.

Nonostante le affinità architetturali, questi due domini non hanno la stessa attività catalitica, uno ha infatti una funzione catalitica, l'altro è denominato dominio pseudochinasico ed è essenzialmente regolatorio.

Le proteine JAK presentano sette regioni omologhe, denominate domini JAK “homology” (JH): la porzione carbossiterminale di queste molecole comprende il dominio ad attività chinasi e quello pseudochinasico, rispettivamente JH1 e JH2, il primo dei quali è provvisto di tutte le caratteristiche delle molecole ad attività tirosinchinasica, come il residuo di acido aspartico localizzato nel “catalytic loop” e direttamente coinvolto nel processo di trasferimento del gruppo fosfato. La porzione amino terminale si articola nei tre domini JH5, JH6 e JH7, e presenta al suo interno una sequenza *Four point one Ezrin Radixin Moesin* (FERM) tramite la quale le chinasi JAK interagiscono coi recettori citochinici; la porzione rimanente, invece, si articola nei due domini JH3 e JH4, che

presentano un grado significativo di omologia coi domini “Src-homology-2” (SH2).

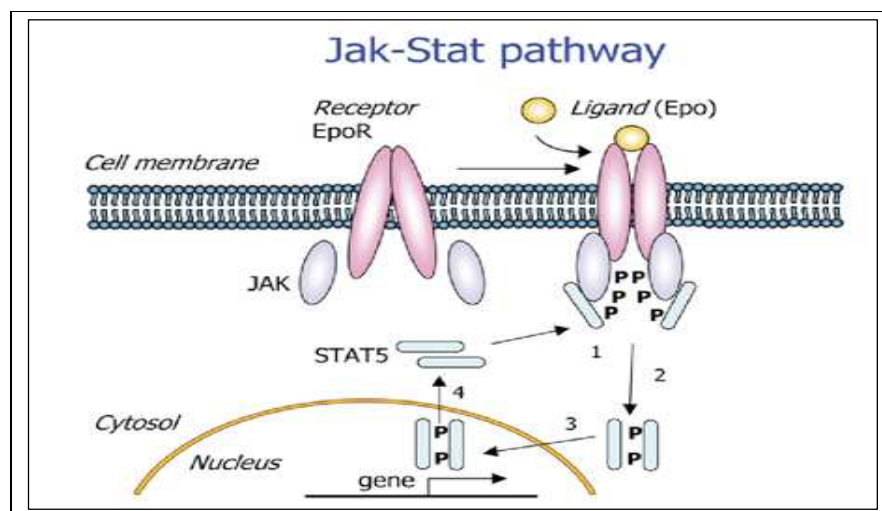
Il modello descrittivo dell'attività di queste proteine attualmente accettato attribuisce al dominio JH2 una funzione inibitoria sull'attività catalitica del dominio JH1, attraverso un'interazione intramolecolare che si instaurerebbe fra l'apice dell'“activation loop”, presente nel dominio catalitico di JH1, e l'ansa contenente il residuo V617, localizzato nel dominio JH2.

La superfamiglia dei recettori citochinici, con cui i componenti della famiglia JAK interagiscono ai fini della efficace trasduzione del segnale, comprende proteine integrali di membrana, ciascuna dotata di un singolo segmento transmembrana, ma sprovviste di attività enzimatica intrinseca. Attraverso la loro porzione intracitoplasmatica, tuttavia, queste proteine entrano in contatto con uno o più membri della famiglia JAK, attraverso le sequenze recettoriali “Box-1” e “Box-2”. Tale superfamiglia può essere suddivisa in recettori di tipo I e recettori di tipo II. A fronte di queste diversità strutturali, entrambi i tipi di recettori citochinici si attivano a seguito del legame del loro specifico ligando al dominio extracellulare della proteina, che cambia conformazione e va incontro ad attiva dimerizzazione od oligomerizzazione, a seguito della quale le molecole JAKs, presenti sul versante intracitoplasmatico del recettore, vengono a trovarsi giustapposte e innescano la cascata intracellulare del segnale attraverso una reciproca cross-fosforilazione in corrispondenza delle loro “activation loops”. I recettori di tipo I comprendono i

recettori per l'EPO (figura 1), per la TPO, per l'ormone della crescita ed inoltre recettori eteromerici, contenenti la catena comune gamma ( $\gamma_c$ ), comprendenti i recettori per l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-13, l'IL-15 e l'IL-21. I recettori di tipo II, invece, sono attivi sotto forma di complessi proteici eterodimerici e mediano la trasduzione del segnale innescato dagli interferoni alfa, beta e gamma, e da varie interleuchine (IL-22, IL-24, IL-28, IL-29); questa categoria recettoriale non presenta delle sequenze intracitoplasmatiche "Box 1" e "Box 2" ben definite, come nel caso dei recettori citochinici di tipo I, per cui l'associazione molecolare con i membri della famiglia JAK potrebbe avvenire con meccanismi differenti che non sono ancora adeguatamente conosciuti.

È stato documentato come TYK2 sia primariamente coinvolta nei processi di trasduzione del segnale mediati dagli interferoni alfa, beta e dall'IL-12 e IL-23; allo stesso tempo, è stato delucidato il ruolo diretto svolto dalla molecola JAK2 nella trasduzione del segnale mediata dall'EPO, dall'ormone della crescita e nella via di segnalazione intracellulare innescata dall'interferone gamma. È stato dimostrato come i recettori che agiscono in forma omodimerica e quelli che contengono la sub-unità beta-c utilizzino quasi esclusivamente la molecola JAK2 come "linker" biochimico intracitoplasmatico con gli effettori situati più a valle lungo il "pathway" di attivazione trascrizionale. JAK3 costituisce, invece, un'eccezione tra le tirosin-chinasi appartenenti alla famiglia JAK, in quanto si contraddistingue per la peculiarità

di complessarsi esclusivamente coi recettori contenenti la subunità  $\gamma_c$ , partecipando, quindi, all'attivazione cellulare indotta da IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21. La famiglia delle chinasi JAK è coinvolta in numerose segnalazioni da parte interleuchine. In sintesi sembra che specifiche JAK chinasi, da sole o in combinazione, possono essere attivate preferenzialmente a seconda del tipo di recettore che viene attivato e a seguito di ciò diversi STATs vengono attivati per la trasduzione del segnale.<sup>44</sup>



**Figura 1. Janus Chinasi e recettori citochinici di tipo I**

In condizioni fisiologiche il legame tra EPO e recettore consente l'attivazione delle tirosin chinasi JAK2, che sono legate ad una porzione intracitoplasmatica del recettore per l'EPO. All'attivazione di JAK2 consegue la fosforilazione di diverse molecole intracellulari, come STAT5, che trasducono il segnale. La fosforilazione di STAT5 ne determina la dimerizzazione e la traslocazione nel nucleo, dove il dimero STAT5 agisce come fattore di trascrizione e induce l'espressione genica. Quando si ha la mutazione JAK2V617F o la mutazione dell'esone 12, la JAK2 chinasi è costituzionalmente attiva in assenza di EPO.

## **CYT387**

CYT387 è una piccola molecola, un potente e selettivo “ATP-competitive” inibitore di JAK2 e JAK1 in vitro, che inoltre in esperimenti “ex vivo” condotti su cellule eritroidi di pazienti con PV e nel modello di topo transgenico di MPN è stato efficace nel modificare il decorso della malattia.

CYT387 mostra una potente attività in vitro come inibitore nei confronti di cellule dipendenti dall’attività di JAK2, inclusa la mutazione JAK2V617F associata con l’eziopatogenesi di PV e degli altri MPN, ma mostra allo stesso tempo una minima attività inibitoria verso altre linee cellulari, comprese linee cellulari di diversi tipi di tumori. Inoltre, CYT387 è un potente inibitore di JAK2 e di colonie con la mutazione V617F in maniera dose dipendente, suggerendo una potenziale attività nei confronti delle MPN.

In uno studio sugli effetti della somministrazione di CYT387 due volte al giorno (25 e 50 mg/kg) in un modello di topo transgenico di MPN umana mediata da JAK2, c’è stata una normalizzazione della conta leucocitaria entro una settimana di somministrazione di CYT387 e dell’eritrocitosi entro sei settimane. Dopo 56 giorni di trattamento con CYT387 la splenomegalia si è ridotta come anche la eritropoiesi extramidollare, inoltre la normale eritropoiesi è stata ripristinata a livello midollare in maniera dose dipendente.<sup>45,46</sup>

### **Gli effetti di CYT387 sulle citochine plasmatiche nei modelli murini di MPN**

I pazienti con PMF presentano aumentate concentrazioni plasmatiche di citochine infiammatorie, come l'IL-6, che si pensa siano responsabili della comparsa di sintomi costituzionali, della splenomegalia e dell'anemia che caratterizzano la malattia. Quindi si può ipotizzare che la risposta a CYT387 può essere associata ad una normalizzazione della espressione di citochine anormali. A tal proposito sono stati collezionati campioni di plasma da due gruppi di topi durante la sperimentazione: i topi trattati ed i controlli non trattati. Su questi campioni di plasma è stata misurata l'espressione di un "panel" di 32 diverse citochine e chemochine usando un test multiplex. È stato trovato che i livelli plasmatici basali di 13 citochine infiammatorie cardine e chemochine, IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-17, IP-10, fattore inibitorio Leucemia (LIF), proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1), monochina indotta da IFN- $\gamma$  (MIG), fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), erano elevate nei topi trattati rispetto ai controlli normali "naive" ( $p \leq 0.1$ ).

La maggior parte di queste citochine e chemochine ha mostrato una riduzione dose-dipendente nei topi trattati con CYT387 fino o quasi ai livelli normali, anche se in misura variabile. Ad esempio, le concentrazioni di IFN- $\gamma$ , IL-3, VEGF, IL-17, IL-9, LIF e IL-1 $\beta$ , nei topi trattati con la dose di 50 mg /

kg di CYT387 e nei topi normali erano identiche o quasi identiche. Al contrario, le concentrazioni di TNF- $\alpha$  , IL-6 , IL-10, IFN-inducibile della proteina-10 (IP-10), cheratinociti “chemoattractant” (KC) e MCP-1 sono rimaste elevate rispetto ai topi normali. Al contrario, tre citochine [fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF), IL-12p40 e IL-1 $\alpha$ ] sono risultate significativamente ridotte nei topi malati trattati rispetto ai normali topi “naive”. È interessante notare, che e le concentrazioni di IL-10 di G-CSF sono state simili nei topi malati trattati rispetto ai topi normali “naive”. Tuttavia, l’IL-10 è stata significativamente *down*-regolata da CYT387 e G-CSF è stato significativamente *up*-regolato in seguito al trattamento con CYT387 rispetto ai normali topi “naive”. Nel complesso, questi dati indicano che i topi con JAK2V617F mostrano una malattia indotta da una perturbazione complessa di citochine e chemochine, espressione che è almeno in parte normalizzata da CYT387.<sup>45,46</sup>



## **Obiettivo dello studio**

L'espressione di livelli anormali di citochine circolanti che accompagna il processo di malattia nella PMF<sup>1</sup> sembra essere sostenuto dall'azione delle JAK chinasi, soprattutto della JAK-1 chinasi. È stato dimostrato che i livelli di citochine proinfiammatorie sono *down*-regolati soprattutto dalla terapia con inibitori delle JAK1/2 chinasi.<sup>39</sup> CYT387 è un potente inibitore di JAK-1/2, che sopprime la crescita in vitro di cellule con la mutazione JAK2V617F ed è stato efficace in un modello murino di MPN anche nella normalizzazione dei livelli di citochine.<sup>45,46</sup>

Il nostro obiettivo è quello di valutare se i livelli basali di citochine circolanti ed altre variabili clinico-laboratoristiche, compresa la presenza della mutazione JAK2V617F, possano essere considerati come predittivi di risposta dell'anemia e della splenomegalia in pazienti affetti da mielofibrosi arruolati nello studio di fase I/II con CYT387.

## Disegno dello studio

La sicurezza, la tollerabilità, ed il comportamento farmacocinetico di CYT387 sono stati testati in uno studio di Fase I “dose-escalation” non randomizzato (Cytopia) in pazienti con PMF e post-PV o post-ET mielofibrosi, ad alto rischio o a rischio intermedio. CYT387 è stato somministrato per via orale una volta al giorno in cicli di 28 giorni. Una volta che la tossicità dose-limitante (DLT) è stata identificata, una coorte di dose-conferma ha iniziato il trattamento con la dose massima tollerata (MTD) o con una dose inferiore a quest’ultima.<sup>49</sup>

Sono stati collezionati campioni di plasma dei soggetti arruolati nello studio Cytopia per poter valutare i livelli basali di diverse citochine infiammatorie e chemochine.

I pazienti sono stati screenati per la mutazione JAK2V617F ed è stata inoltre determinata, nei pazienti portatori della suddetta mutazione, la percentuale di *allele burden* sia allo *screening* che dopo il trattamento con CYT387.

Una volta valutata la risposta al trattamento, soprattutto in termini di anemia e splenomegalia, secondo i criteri IWG,<sup>48</sup> è stato possibile esaminare l’eventuale valore predittivo nella risposta dei livelli basali di citochine e di diversi parametri clinici in questo “subset” di pazienti.

## **Materiali e metodi**

Lo studio di fase I/II Cytopia è stato approvato dal Comitato di Etico della Mayo Clinic di Rochester, MN. I sessanta pazienti inclusi nel protocollo Cytopia hanno firmato un consenso informato scritto per la raccolta dei campioni di plasma necessari per lo studio delle citochine. Inoltre, il DNA è stato disponibile in tutti i pazienti per la determinazione della mutazione JAK2V617F. Le diagnosi di PMF, post-PV e post-ET mielofibrosi sono state effettuate secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO).<sup>47</sup>

La risposta al trattamento soprattutto in termini di anemia e splenomegalia, è stata valutata secondo i criteri dell' "International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment" (IWG-MRT).<sup>48</sup>

Il sangue periferico è stato raccolto secondo un protocollo utilizzato presso la Mayo Clinic per i pazienti con tumori mieloidi, e procedure standard sono state seguite per centrifugare i campioni a 4 °C e conservare le rispettive aliquote a -80 °C. I livelli sierici di 31 diverse citochine sono stati misurati usando un test ad immunofluorescenza a base di microsfele (Luminex Inc. Austin, TX), e la Luminex Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, fattore di crescita epidermico (EGF), eotassina, FGF-b, GM-CSF, G-CSF, fattore di crescita degli

epatociti (HGF), IFN- $\alpha$ , IFN - $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIG, proteine infiammatorie macrofagiche-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , citochina per il regolamentato e per l'attivazione delle cellule T di norma espressa e secreta (RANTES), TNF- $\alpha$ , e VEGF.

Le misurazioni sono state eseguite su un Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) e i dati risultanti sono stati valutati usando l'Xponent (Luminex Corporation) software.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate considerando i dati ottenuti dal dosaggio delle citochine nei campioni di plasma collezionati prima dell'assunzione di CYT387 e la risposta clinica in termini di anemia e splenomegalia valutata, dopo l'assunzione di CYT387, in base ai criteri IWG-MRT (tabella 1).<sup>48</sup>

I livelli delle citochine dei controlli normali sono stati analizzati attraverso l'analisi univariata per stabilire il valore superiore al quale i livelli delle citochine del nostro campione in studio sono da considerare superiori alla norma. La correlazione tra le variabili nominali esaminate è stata valutata utilizzando il  $\chi^2$  test. Valori di p "value" inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi. Il pacchetto di statistica View Stat (SAS Institute, Cary, NC, USA) è stato utilizzato per tutti i calcoli.

**Tabella 1. IWG Consensus Criteria for Treatment Response<sup>48</sup>**

Response criterion	Parameter
Complete remission (CR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>i. Complete resolution of disease-related symptoms and signs including palpable hepato-splenomegaly.</li> <li>ii. Peripheral blood count remission defined as hemoglobin level at least 110 g/L, platelet count at least <math>100 \times 10^9/L</math> and absolute neutrophil count at least <math>1.0 \times 10^9/L</math>. In addition, all 3 blood counts should be no higher than upper normal limit.</li> <li>iii. Normal leukocyte differential including disappearance of nucleated red blood cells, blasts, and immature myeloid cells in the peripheral smear, in the absence of splenomegaly.</li> <li>iv. Bone marrow histologic remission defined as the presence of age-adjusted normocellularity, no more than 5% myeloblasts, and osteomyelofibrosis grade no higher than 1.</li> </ul>
Partial remission (PR)	Requires all of the above criteria for CR except the requirement for bone marrow histologic remission. However, a repeat bone marrow biopsy is required in the assessment of PR and may or may not show favorable changes that do not however fulfill criteria for CR.
Clinical improvement (CI)	<p>Requires one of the following in the absence of both disease progression (as outlined below) and CR/PR assignment (CI response is validated only if lasts for no fewer than 8 weeks)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i. A minimum 20 g/L increase in hemoglobin level or becoming transfusion independent (applicable only for patients with baseline hemoglobin level of less than 100 g/L).</li> <li>ii. Either a minimum 50% reduction in palpable splenomegaly of a spleen that is at least 10 cm at baseline becomes not palpable.</li> <li>iii. A minimum 100% increase in platelet count and an absolute platelet count of at least <math>50 \times 10^9/L</math> ( applicable only for patients with baseline platelet count below <math>50 \times 10^9/L</math>).</li> <li>iv. A minimum 100% increase in ANC and an ANC of at least <math>0.5 \times 10^9/L</math> (applicable only for patients with baseline absolute neutrophil count below <math>1 \times 10^9/L</math>).</li> </ul>
Progressive disease (PD)	<p>Requires one of the following::</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Progressive splenomegaly that is defined by the appearance of a previously absent splenomegaly that is palpable greater than 5 cm below the left costal margin or a minimum 100% increase in palpable distance for baseline splenomegaly or greater than 10 cm.</li> <li>ii. Leukemic transformation confirmed by a bone marrow blast count of at least 20%.</li> <li>iii. An increase in peripheral blood blast percentage of at least 20% that lasts for at least 8 weeks.</li> </ul>
Stable disease (SD)	None of the above.
Relapse: Loss of CR, PR, or CI	In other words, a patient with CR or PR is considered to have undergone relapse when he or she no longer fulfills the criteria for even CI. However, changes from either CR to PR or CR/PR to CI should be documented and reported.

## **Risultati**

La popolazione in studio consiste di 60 pazienti affetti da PMF, post-PV MF o post-ET MF (età media 65 anni, range 34-85; 65% maschi), arruolati nel protocollo di fase I/II Cytopia a partire dal novembre 2009.

Il DIPSS-plus<sup>49</sup> all'arruolamento è stato intermedio-1 nel 5% , intermedio-2 nel 65% ed alto rischio nel 30% dei pazienti; in relazione al rischio citogenetico, l'83%, ha presentato un cariotipo favorevole ed il 17% un cariotipo sfavorevole;<sup>42</sup> 33 pazienti (55%) sono stati trasfusione-dipendenti.

Il 75% dei 60 pazienti testati è risultato positivo per la mutazione JAK2V617F.

Quarantasei pazienti (87%) presentavano una splenomegalia >10 cm; il 18% sono stati precedentemente trattati con INCB018424, il 5% con TG101348 ed il 22% con Pomalidomide (tabella 2).

**Tabella 2.** Baseline characteristics of 60 patients with myelofibrosis enrolled in CYT387 JAK inhibitor clinical trial

Variables	All patients (n=60)
Age (years); median (range)	65 (34-85)
Sex; n (%)	
Male	39(65%)
Female	21(35%)
Hemoglobin, g/dl; median (range)	9.2 (4.7-14.4)
Leukocyte count, $\times 10^9/L$ ; median (range)	9.7 (1.9-122.4)
Platelet count, $\times 10^9/L$ ; median (range)	156 (51-738)
*DIPSS-plus; n (%)	
Low	0
Intermediate-1	3 (5%)
Intermediate-2	39 (65%)
High	18 (30%)
Myelofibrosis subtype; n (%)	
Primary myelofibrosis	41 (68%)
Post-polycythemia vera myelofibrosis	12 (20%)
Post-essential thrombocythemia myelofibrosis	7 (12%)
Constitutional symptoms; n (%)	45 (75%)
Circulating blasts $\geq 1\%$ ; n (%)	54 (90%)
Hemoglobin $<10$ g/dl; n (%)	42 (70%)
Red cell transfusion requiring; n (%)	33 (55%)
Leukocytes $>25 \times 10^9/L$ ; n (%)	15 (25%)
**Palpable spleen $> 10$ cm; n (%)	46 (87%)
Splenectomy; n (%)	4 (7%)
Cytogenetic risk; n (%)	
Favorable	50 (83%)
Unfavorable	10 (17%)
#Karyotype; n (%)	
normal	29 (48%)
sole 13q-	7 (12%)
sole chromosome 1 translocation/duplication	2 (3%)
sole 20q-	5 (8%)
other sole abnormality	3 (5%)
two abnormalities excluding unfavorable kind	4 (7%)
sole +8	1 (2%)
two abnormalities including unfavorable kind	3 (5%)
complex	6 (10%)
JAK2V617F status n tested (% positive)	60 (75%)
***Previous therapy; n (%)	50 (83%)
Previous JAK2 inhibitor therapy; n (%)	14 (23%)
INCB018424	11 (18%)
TG101348	3 (5%)
Previous pomalidomide therapy; n (%)	13 (22%)

\*DIPSS, Dynamic Prognostic Scoring System.

\*\* Data for 53 patients with a palpable spleen at baseline. Four patients had splenectomy.

\*\*\* Previous therapies included hydroxyurea, thalidomide, lenalidomide, pomalidomide, interferon, radiation therapy, transplant, androgen, erythropoietic-stimulating agents, JAK2 inhibitors (INCB018424 or TG101348).

# Sole chromosome 1 translocation/duplication: t(1;6)(q21;p23); +add(1)(p22); other sole abnormality: add(6)(p21.3); add(13)(q12), add(18)(q21); two abnormalities excluding unfavorable kind: del(13)(q21.2q34), add(18)(q21);

ins(13;4)(q12;q31.1q35), del(20)(q11.2q13.3); t(1;9)(p10;q10), -Y ; del(13)(q12q14), add(6)(p21.1); two abnormalities including unfavorable kind: +8, del(20)(q11.2q13.3); del(11q), add(7q); del(7)(q22q34), del(20)(q11.2q13.3).

Il disegno dello studio di fase I, per testare la sicurezza e la tollerabilità del farmaco CYT387, prevedeva una fase di “dose escalation” e una fase di “dose confirmation”. La dose massima tollerata è stata definita a 300 mg/die (la “starting dose” minima è stata di 100 mg/die e la “starting dose” massima di 400 mg/die). Solamente tre soggetti hanno interrotto il trattamento per cause non correlate al farmaco: uno con malattia stabile (IWG-MRT)<sup>48</sup> sottoposto a trapianto allogenico e due pazienti sono morti per comorbidità. Il follow-up mediano è stato di 4.9 mesi (0.9-12.5). Le risposte al trattamento in termini di anemia e splenomegalia sono state valutate in base ai criteri IWG.<sup>48</sup> Ventuno pazienti valutabili (50%), il 57% dei quali erano dipendenti da trasfusione, hanno risposto per quanto riguarda l’anemia in termini di “clinical improvement” (CI), in media dopo 4 settimane (2-16) dall’inizio del trattamento. La riduzione del 50% della splenomegalia (CI) si è osservata in 25 pazienti valutabili (45%), in media dopo 2 settimane (1-16) dall’inclusione nello studio<sup>50</sup> (tabella 3).



**Tabella 3. Anemia and spleen response**

	Anemia response		Spleen response ^
<b>All doses Responders</b> N (%)	Total* Transfusion dependent** Transfusion independent***	21 (50%) 19 (57%) 2 (22%)	25 (45%)
<b>Time to response median (range)</b>	4 weeks (2-16)		2 weeks (1-16)
<b>Duration of response median (range)</b>	8 weeks (8-36)		10 weeks (8-36)
<b>Patients starting at 150 mg/day (n=21) Responders</b>	Total* Transfusion dependent** Transfusion independent***	7 (41%) 6 (43%) 1 (33%)	9 (43%)
<b>Time to response median (range)</b>	4 weeks (4-12)		3 weeks (1-8)
<b>Duration of response median (range)</b>	10 weeks (8-36)		15 weeks (8-42)
<b>Patients starting at 300 mg/day (n=27) Responders</b>	Total* Transfusion dependent* * Transfusion independent***	11 (58%) 11 (69%) 0	12 (50%)
<b>Time to response median (range)</b>	2 weeks (2-8)		1 week (1-4)
<b>Duration of response median (range)</b>	8 weeks (8-28)		8 weeks (8-30)

\* 42 evaluable patients among 60 enrolled, 17 among 21 patients started at 150 mg/d and 19 among 27 patient started at 300 mg/d. \*\* 33 patients among 60 patients enrolled, 14 among 21 patients started at 150 mg/d and 16 among 27 patients started at 300

mg/d.\*\*\*Patients with Hgb<10 g/dl at baseline: 9 evaluable patients among 60 patients enrolled, 3 among 21 patients started at 150 mg/d and 3 patients among 27 patients started at 300 mg/d.

^ 56 patients evaluable with a palpable spleen at baseline among 60 patients enrolled, 24 evaluable among 27 patients started at 300 mg/d.

#### **a) Analisi del ruolo predittivo di diverse variabili clinico-laboratoristiche**

Diverse variabili clinico-laboratoristiche, tra cui la mutazione JAK2V617F, sono state confrontate tramite lo  $\chi^2$  test con i due gruppi di “responders” rispettivamente per l’anemia e la splenomegalia (tabella 4). L’assenza della mutazione JAK2V617F ha correlato in maniera statisticamente significativa con la riduzione della splenomegalia del 50% ( $p=0.03$ ). Nei pazienti positivi per JAK2V617F non si è osservata una riduzione dell’*allele burden* dopo tre cicli di terapia. Inoltre la presenza di una splenomegalia inferiore al valore mediano di 18 cm (0-32 cm) ( $p=0.0004$ ), il precedente trattamento con inibitori di JAK2 (INCB018424 or TG101348) ( $p=0.01$ ), soprattutto in pazienti trasfusione dipendenti ( $p=0.006$ ), e con eritropoietina ( $p=0.02$ ) sono risultati predittivi di risposta per quanto riguarda la splenomegalia. Per la risposta all’anemia, il CI correla con: la presenza di sudorazioni notturne in pazienti trasfusione dipendenti ( $p=0.03$ ) e con il precedente trattamento con lenalidomide ( $p=0.008$ ) e talidomide ( $p=0.04$ ).

**Tabella 4. Variabili clinico-laboratoristiche predittive di risposta all'anemia e alla splenomegalia**

Variable	Anemia response		Spleen response	
	p-value (all evaluable) n=42	p-value (transfusion dependent) n=33	p-value (all evaluable)n=53	p-value (transfusion dependent) n=27
Age >65 yrs	0.8	0.6	0.7	0.3
Absence of <i>JAK2V617F</i>	0.5	0.6	0.03	0.01
Karyotype	0.7	0.7	0.5	0.9
MF variant	0.2	0.1	0.7	0.6
DIPSS-Plus category	0.7	0.6	0.3	0.5
Constitutional symptoms at baseline (pruritus, bone pain, fever)	0.3	0.1	0.2	0.3
WBC >25x10 <sup>9</sup> /L	0.4	0.4	0.2	0.2
Platelet count <100 x10 <sup>9</sup> /L	>0.9	0.7	0.4	0.7
Smaller spleen size (<18 cm)	0.4	0.6	0.0004	0.04
Presence of night sweats at baseline	0.09	0.03	0.9	0.9
Prior cytoreductive therapy (incl. HU)	0.6	0.6	0.4	0.8
Prior pomalidomide therapy	0.5	0.3	0.6	0.6
Prior lenalidomide therapy	0.008	0.001	0.4	0.3
Prior thalidomide therapy	0.04	0.03	0.4	0.3
Prior JAK inhibitor (INCB018424 or TG101348)	0.7	0.9	0.01	0.006
Prior ESA therapy	0.7	0.3	0.02	0.2

## **b) Analisi del ruolo predittivo delle citochine circolanti**

Come indicato nella sezione dei metodi, i campioni di plasma archiviati sono stati utilizzati per misurare i livelli *baseline* di citochine nella popolazione in studio ( $n = 60$ ), che sono stati poi confrontati con i livelli plasmatici di citochine nei controlli "normali" ( $n = 35$ ). I livelli di 29 citochine nei 60 pazienti studiati sono stati considerati elevati quando superiori a 3 deviazioni standard della media dei valori delle citochine del campione normale. Comparando con il  $\chi^2$  test le citochine con valori elevati rispetto alla norma con i gruppi dei "responders" in termini di anemia e splenomegalia, secondo i criteri IWG-MRT,<sup>48</sup> si è osservata una correlazione tra la risposta alla splenomegalia e livelli elevati di EGF ( $p=0.01$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0.01$ ), G-CSF ( $p=0.03$ ), IFN- $\alpha$  ( $p=0.02$ ), MIP-1 $\beta$  ( $p=0.006$ ), VEGF ( $p=0.03$ ), e di HGF ( $p=0.01$ ) e MIG ( $p=0.01$ ) solamente nel gruppo dei "responders" alla splenomegalia trasfusione dipendenti (tabella 5).

Nessuna correlazione è stata trovata tra i livelli elevati delle suddette citochine e la risposta all'anemia; l'unica citochina che ha un valore predittivo in termini di risposta all'anemia è l'eotassina ( $p=0.006$ ), che non ha mostrato livelli elevati rispetto ai controlli normali e per tale motivo è stata valutata per valori inferiori al *cut-off* di riferimento (tabella 5).

**Tabella 5. Citochine circolanti predittive di risposta all'anemia e alla splenomegalia**

Cytokine	Anemia response		Spleen response	
	p-value All evaluable (n=42)	p-value Transfusion- dependent (n=33)	p-value All evaluable (n=53)	p-value Transfusion- dependent (n=27)
Increased EGF	0.6	0.3	0.01	0.01
Increased TNF- $\alpha$	0.4	0.6	0.01	0.05
Increased G-CSF	0.9	0.9	0.03	0.08
Increased IFN- $\alpha$	0.5	0.6	0.02	0.03
Increased MIP-1 $\beta$	0.8	0.6	0.006	0.004
Increased HGF	0.6	0.8	0.2	0.01
Increased MIG	0.9	0.9	0.5	0.01
Increased VEGF	0.8	0.9	0.03	0.008
Decreased Eotaxin	0.006	0.006	0.1	0.4

## **Discussione**

I livelli elevati di citochine circolanti sono responsabili oltre che della fibrosi a livello midollare, anche dei sintomi costituzionali e della splenomegalia nella PMF. Anche se non si conosce esattamente il meccanismo attraverso il quale esse possano determinare il quadro della malattia, è chiaro che esse agiscono attivando il “pathway” delle JAK chinasi, soprattutto della JAK chinasi 1 e della JAK chinasi 2.

L'impiego di nuove molecole di inibitori di JAK1/2 ha mostrato sia in studi di fase I/II, che in modelli murini di MPN, che questi farmaci sono attivi nel modificare il quadro clinico, la splenomegalia e l'anemia. Abbiamo quindi pensato di considerare diverse variabili cliniche, compresa la mutazione V617F, e i livelli basali di citochine plasmatiche in relazione alla risposta in termini di anemia e splenomegalia nei pazienti affetti da mielofibrosi, trattati con CYT387, per valutare se queste variabili, o comunque quali tra queste, possano essere predittive di risposta al farmaco in modo da poter selezionare un “subset” di “responders” in base a questi criteri.

Dai risultati ottenuti si evince che diverse variabili cliniche correlano con la risposta, ed è soprattutto utile notare come pazienti precedentemente trattati con inibitori della neoangiogenesi o inibitori di JAK2 rispondano al trattamento con CYT387. Ciò è utile per poter prevedere l'efficacia di questo nuovo farmaco in pazienti trattati con altre linee di terapia. La presenza della mutazione di JAK2V617F non

correla con la risposta all'anemia e alla splenomegalia, bensì l'assenza di tale mutazione è predittiva di risposta per quanto riguarda la splenomegalia. Un'ipotesi che possa spiegare ciò è legata all'azione inibitoria del farmaco anche nei confronti di JAK1 e alla modulazione dello stesso nei confronti della trasduzione del segnale per l'attivazione dei recettori citochinici. Inoltre i livelli di JAK2V617F *allele burden* valutati prima e dopo tre cicli di trattamento non hanno mostrato modifiche indotte da CYT387. Tale farmaco non ha determinato una risposta molecolare a tre mesi, al contrario di quello che si osserva impiegando altri inibitori delle tirosinchinasi nella leucemia mieloide cronica. Comunque è necessario un *follow-up* più lungo per valutare questo aspetto in relazione all'utilizzo di CYT387.

Per quanto riguarda il ruolo predittivo delle citochine sulla risposta all'anemia, l'unica che correla con essa è l'eotassina ( $p=0.006$ ). Tale citochina è stata riscontrata a livelli più bassi rispetto ai controlli normali soprattutto nei pazienti "responders" per l'anemia. L'eotassina è implicata principalmente nel reclutamento e nell'attivazione degli eosinofili, ma è stato visto che ha anche un ruolo nell'attivazione dei fibroblasti attraverso il "pathway" JAK/STAT e ciò potrebbe influire sulla fibrosi midollare.<sup>51-53</sup> Un'ipotesi potrebbe essere che i pazienti che presentano livelli più bassi di questa citochina possano avere un grado di fibrosi midollare inferiore o più sensibile all'azione del farmaco, e che rispondano meglio al trattamento per tale caratteristica del

microambiente. Purtroppo non disponiamo al momento di dati che possano supportare questa ipotesi, ma potrebbe essere oggetto di studi futuri.

Valori elevati delle citochine EGF, TNF- $\alpha$ , G-CSF, INF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HGF, MIG e VEGF sono risultati predittivi di risposta al trattamento con CYT387 per quanto riguarda la splenomegalia. Inoltre questi pazienti “responders” per la splenomegalia hanno mostrato anche una completa risoluzione dei sintomi costituzionali inclusi i prurito, le sudorazioni notturne ed il dolore osseo. Le suddette citochine sono implicate nei meccanismi di fibrosi midollare, nella patogenesi della emopoiesi extramidollare e dei sintomi costituzionali.<sup>54</sup> Sarebbe interessante analizzare i livelli di queste citochine circolanti durante il *follow-up* per verificare se esse presentano una riduzione o una normalizzazione dei livelli durante il trattamento con CYT387. Inoltre sarebbe utile valutare eventuali modifiche della cellularità e del grado di fibrosi a livello midollare prima e dopo il trattamento, dato che potrebbero essere modificati dal trattamento<sup>55</sup> soprattutto nei pazienti “responders” per quanto riguarda l’anemia. Questi dati potrebbero supportare ulteriormente l’efficacia di CYT387.



In conclusione, la nostra sperimentazione evidenzia che pazienti con elevati livelli EGF, TNF- $\alpha$ , G-CSF, INF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HGF, MIG e VEGF, con assenza della mutazione JAK2V617F e precedentemente trattati con INCB018424 o TG101348, talidomide o pomalidomide rispondono al trattamento con CYT387 soprattutto per quanto riguarda la risposta alla splenomegalia. Quindi ciò potrebbe permettere di selezionare un “subset” di pazienti che potrebbero trarre dei vantaggi in termini di risposta e di qualità di vita dal trattamento con questo nuovo JAK2/1 inibitore.

## Bibliografia

1. Ridell B, Carneskog J, Wedel H, Vilén L, Høgh Dufva I, Mellqvist UH, Brywe N, Wadenvik H, Kutti J. Incidence of chronic myeloproliferative disorders in the city of Göteborg, Sweden 1983-1992. *Eur J Haematol*. 2000 Oct;65(4):267-7
2. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):10-5.
3. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*. 1998 Aug;102(3):684-90.
4. Tefferi A, Barbui T. bcr/abl-negative, classic myeloproliferative disorders: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005 Sep;80(9):1220-32.
5. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian Registry of Myelofibrosis. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4030-6. Epub 2007 Aug 21.
6. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):673-83.
7. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
8. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355:2452-2466.
9. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:385-393.
10. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228:273-287.
11. Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:122-131.
12. Pesu M, Laurence A, Kishore N, Zwillich SH, Chan G, O'Shea JJ. Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev*. 2008;223:132-142.
13. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, et al: Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 96:3374-3380, 2000.

14. Tefferi A: The pathogenesis of chronic myeloproliferative diseases. *Int J Hematol* 73:170-176, 2001.
15. Greenberg BR, Woo L, Veomett IC, et al: Cytogenetics of bone marrow fibroblastic cells in idiopathic chronic myelofibrosis. *Br J Haematol*, 66:487-490, 1987.
16. Wang JC, Lang HD, Lichter S, et al: Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 80:184-188, 1992.
17. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, et al: Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 59:1046-1054, 1982.
18. Martyre MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, et al: Transforming growth factor beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 88:9-16, 1994.
19. Rameshwar P, Denny TN, Stein D, et al: Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines: Potential role for interleukin-1 and TGF beta. *J Immunol* 153:2819-2830, 1994.
20. Medinger M, Skoda R, Gratwohl A, Theocharides A, Buser A, Heim D, Dirnhöfer S, Tichelli A, Tzankov A. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-/receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. *Br J Haematol*. 2009 Jul;146(2):150-7. Epub 2009 May 19.
21. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, et al: Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 96:1342-1347, 2000.
22. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al: Increased and pathological emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood* 104:3573-3580, 2004.
23. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, et al: Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin induced myelofibrosis in mice. *Blood* 100:3495-3503, 2002.
24. Yanagida M, Ide Y, Imai A, et al: The role of transforming growth factor-beta in PEGrHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. *Br J Haematol* 99:739-745, 1997.
25. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, et al. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood* 86:4025-4033, 1995.
26. Yan XQ, Lacey D, Hill D, et al: A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice induced by overexpressing thrombopoietin (mpl ligand): Reversal of disease by bone marrow transplantation. *Blood* 88:402-409, 1996.
27. Villeval JL, Cohensolal K, Tulliez M, et al: High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 90:4369-4383, 1997.

28. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al: Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood* 100:1123-1132, 2002.
29. Kaushansky K: Thrombopoietin: The primary regulator of platelet production. *Blood* 86:419-431, 1995.
30. Vyas P, Ault K, Jackson CW, et al: Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 93:2867-2875, 1999.
31. Frey BM, Rafii S, Teterson M, et al: Adenovector-mediated expression of human thrombopoietin cDNA in immune-compromised mice: Insights into the pathophysiology of osteomyelofibrosis. *J Immunol* 160:691-699, 1998.
32. Abina MA, Tulliez M, Lacout C, et al: Major effects of TPO delivered by a single injection of a recombinant adenovirus on prevention of septicemia and anemia associated with myelosuppression in mice: Risk of sustained expression inducing myelofibrosis due to immunosuppression. *GeneTher* 5:497-506, 1998.
33. Ihle, J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591–594.
34. Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 369–398.
35. Ihle, J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331–334.
36. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:385-393.
37. Jeong EG, Kim MS, Nam HK, et al. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin Cancer Res.* 2008;14:3716-3721.
38. Flex E, Petrangeli V, Stella L, et al. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2008;205:751-758.
39. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2010 Sep 16;363(12):1117-27.
40. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A.. Circulating Interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 Levels Are Independently Prognostic in Primary Myelofibrosis: A Comprehensive Cytokine Profiling Study. *J Clin Oncol.* 2011 Feb 7. [Epub ahead of print]
41. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Cazzola M, Tefferi A. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood.* 2010 Oct 14;116(15):2857-8.

42. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, Hanson C, Pardanani A, Tefferi A. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*. 2010 Oct 14. [Epub ahead of print].
43. Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;636-42.
44. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228 (1) :273-87.
45. Tyner JW, Bumm TG, Deininger J, Wood L, Aichberger KJ, Loriaux MM, Druker BJ, Burns CJ, Fantino E, Deininger MW. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5232-40. Epub 2010 Apr 12.
46. Pardanani A, Lasho T, Smith G, Burns CJ, Fantino E, Tefferi A. CYT387, a selective JAK1/JAK2 inhibitor: in vitro assessment of kinase selectivity and preclinical studies using cell lines and primary cells from polycythemia vera patients. *Leukemia*. 2009 Aug;23(8):1441-5. Epub 2009 Mar 19.
47. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951.
48. Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, Cervantes F, Deeg HJ, Reilly JT, Verstovsek S, Dupriez B, Silver RT, Odenike O, Cortes J, Wadleigh M, Solberg LA Jr, Camoriano JK, Gisslinger H, Noel P, Thiele J, Vardiman JW, Hoffman R, Cross NC, Gilliland DG, Kantarjian H; IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1497-503.
49. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, Van Dyke D, Hanson C, Wu W, Pardanani A, Cervantes F, Passamonti F, Tefferi A. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392-7. Epub 2010 Dec 13.
50. Animesh Pardanani, MBBS, PhD, Geeta George, P.A.-C Terra Lasho, MT, (ASCP), William J. Hogan, MBBCH, BA, MRCPI, Mark R. Litzow, MD, Kebede Begna, MD, Curtis A. Hanson, MD, Rose Fida, Chris Burns, Gregg D Smith and Ayalew Tefferi, MD. A Phase I/II Study of CYT387, An Oral JAK-1/2 Inhibitor, In Myelofibrosis: Significant Response Rates In Anemia, Splenomegaly, and Constitutional Symptoms. *Blood* vol.116. 52<sup>nd</sup> ASH annual meeting, Orlando December 4-7 2010, Abstract# 460.

51. Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol*. 2000 Mar;30(3):914-9.
52. Olsson S, Cagnoni F, Dignetti P, Melioli G, Canonica GW. Low concentrations of cytokines produced by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells have potent effects on nasal polyp-derived fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 2003 May;132(2):254-60.
53. Wong CK, Zhang J, Ip WK, Lam CW. Intracellular signal transduction in eosinophils and its clinical significance. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002 May;24(2):165-86.
54. Tefferi A, Kantarjian HM, Pardanani AD, Mesa RA, Newton RC, Scherle PA, et al. The Clinical Phenotype of Myelofibrosis Encompasses a Chronic Inflammatory State That Is Favorably Altered by INCB018424, a Selective Inhibitor of JAK1/2. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2008; 112: 2804.
55. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005 Aug;90(8):1128-32